انتاج السليوليزات من *Aspergillus sp.* المعزول محلياً ودراسة بعض خصائصها واستخداماتها التطبيقية

4- دراسة بعض خصائص انزيمي السليوليز والسلوبابيز

اسوان حمدالله عبود البيار العاني اكرم ثابت الراوي

قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية /كلية الزراعة /جامعة بغداد

المستخلص

درست بعض الخصائص المهمة لأنزيمي السليوليز والسلوبابيز المنتجة من *Aspergillus sp.*A18 . ظهر ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السليوليز BCl والسلوبابيز BCb2 هو 5.0 و 7.0 على الترتيب ، في حين تراوح المدى الأمثل لثبات الأنزيمين بين 5.0- 7.0، وأظهر BCl ثباتاً حرارياً بين 20-40°م لمدة ساعة في حين كان بين 20-60°م لمدة ساعة للأنزيم BCb2. كانت درجة الحرارة المثلى للسليوليز BCl والسلوبابيز BCb2 هي 40°م و 50°م على الترتيب . قدرت قيم Km و Vmax للأنزيم BCl باستخدام مادة السليلوز وCMC المعامل والقش المعامل كمواد تفاعل وبلغت قيم Km 4 ملغم باستخدام السليلوز و0.8 ملغم باستخدام CMC المعامل و 0.33 ملغم باستخدام القش المعامل أما قيم Vmax فقد بلغت 41.66 و20 و10 مايكرومول/ ساعة على الترتيب . أما بالنسبة لأنزيم BCb2 فقد استخدمت مادة السلوبايوز و CMC المعامل كمواد تفاعل ، وبلغت قيم Km له 7.69 و 0.28 ملغم على الترتيب، بينما كانت قيم Vmax 57.14 و 16.66 مايكرومول/ ساعة على الترتيب. جرى تقدير نقاوة الأنزيم باستخدام الهجرة الكهربائية وظهرت حزمة واحدة لكل من أنزيمي BCl و BCb2 وقدرت نقطة التعادل الكهربائي لهما فكانت 3.6 و 4.2 على الترتيب . قدر الوزن الجزيئي لهما بالترشيح الهلامي (Sephadex G-200) فبلغ 104 و 95 كيلودالتون ، على الترتيب . أما عند استخدام تقنية الترحيل الكهربائي بوجود SDS فقد كان الوزن الجزيئي لهما 81.28 و 72.44 كيلودالتون على الترتيب . كان أنزيم السليوليز BCl خالياً من الكاربوهيدرات في حين بلغت نسبة الكاربوهيدرات الكلية في أنزيم السلوبابيز BCb2 13.7% . تم تشخيص الكاربوهيدرات الناتجة من تحليل السليلوز والسلوبايوز بوساطة أنزيمي BCl و BCb2 باستخدام كروماتوكرافي الورقة (PC) وكروماتوكرافي الطبقة الرقيقة (TLC) وتم التأكد من ان نواتج التحليل كانت هي كلوكوز وسلوبايوز .

CELLULASES PRODUCTION FROM LOCAL *ASPERGILLUS SP.* ISOLATE AND ASSESING SOME OF THEIR PROPERTIES AND APPLICATIONS

4- STUDYING SOME PROPERTIES OF CELLULASE AND CELLUBIASE

Aswan H.A. Alani Akram Th. Alrawi

Dept. of Food Science and Biotechnology/ College of Agriculture/ Univ. of Baghdad

Abstract

Certain properties of two enzymes cellulase and cellubiase which produced by *Aspergillus sp.* A18 were investigated. The optimum pH were 5.0 and 7.0, respectively, pH stability were between 5.0-7.0 for both. The enzyme (BCl) retained 100% of its original activity after incubation at 40°C for 60 min., while 30% of the original activity was lost at 50°C for 60 min. The enzyme (BCb2) retained 100% of its original activity after incubation at 60°C for 60 min. The optimum temp. for (BCl) was 40°C while it was 50°C for (BCb2).

The values of Km for BCl were estimated by using three kinds of substrates, cellulose, treated CMC and treated wheat straw, were 4, 0.8 and 0.33 mg respectively. Vmax values were 41.66, 20 and 10 μ mole/hr., respectively. For BCb2, Km and Vmax values were estimated by using two substrates which were cellobiose and treated CMC. Km values were 7.69 and 0.28 mg, respectively, while Vmax values were 57.14 and 16.66 μ mole/hr., respectively. Isoelectric point for BCl was found to be at pH 3.6 and for BCb2 at pH 4.2. Molecular weight determinations for BCl and BCb2 by gel filtration were 104 and 95 KD respectively, while they were 81.28 and 72.44 KD, respectively as determined by SDS- electrophoresis. It was found that BCl without any carbohydrate while BCb2 consisted of 13.7% carbohydrates. The main final reaction products as analyzed by (PC) and (TLC) were shown to be glucose and cellobiose.

* تاريخ استلام البحث 2006/7/8, تاريخ قبول البحث 2007/4/16

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الأول .

(*) part pf Ph.D. dissertation for thr first auther

المقدمة

يؤثر الأس الهيدروجيني تأثيراً كبيراً في فعالية الأنزيم ونتيجة لذلك تتأثر سرعة التفاعلات الأنزيمية، ان نشاط الأنزيم عادة يتحدد بمدى معين من قيم الأس الهيدروجيني يطلق عليه الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية والذي يتأثر بعدة عوامل مثل درجة الحرارة وتركيز مادة التفاعل والقوة الأيونية للوسط ووقت التفاعل وتركيز المحلول المنظم (34) .

أما الأس الهيدروجيني الأمثل للثبات فيعتمد على درجة الحرارة والقوة الأيونية ومواد التفاعل وتركيز الأنزيم وطبيعة المحلول الدارئ وتركيز كل من المنشطات والمثبطات (27). تختلف قيم الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية والثبات لأنزيمات السليوليز المنقاة باختلاف مصادرها ونوعياتها.

تعرف درجة الحرارة المثلى للأنزيمات بأنها الدرجة القصوى التي يبدي فيها الأنزيم فعالية ثابتة خلال مدة زمنية تكون في أقل تقدير بطول المدة الزمنية المحددة لقياس الفعالية ، إذ ان معظم التفاعلات الكيميائية تسير بسرعة أكبر عند رفع درجة الحرارة وان الزيادة في درجة الحرارة تمنح الجزيئات المتفاعلة طاقة حركية عالية تتيح لها فرصة التصادم والالتقاء .

أما حرارة الثبات فتعرف بأنها درجة الحرارة التي يبقى فيها الأنزيم محتفظاً بكامل فعاليته في مدة زمنية تكون بطول مدة قياس الفعالية أو أكثر ويتأثر الثبات الحراري للأنزيمات بعدة عوامل لا سيما الأس الهيدروجيني والقوة الأيونية وطبيعة المحلول المنظم ، ووجود أو غياب مواد التفاعل والمنشطات والمثبطات ومدة الحضن وتركيز الأنزيم (27 ، 34) . تختلف درجات الحرارة المثلى للفعالية وثبات الأنزيمات بصورة عامة ومنها السليوليزات المنقاة وعلى اختلاف مصادرها .

تعد الثوابت الحركية معياراً مهماً للتحري عن ألفة الأنزيم تجاه مواد التفاعل المختلفة أي أنها تكشف عن الملاءمة النسبية لمواد التفاعل لأنزيم معين . قام عدد من الباحثين بتقدير قيم الثوابت الحركية للسليوليزات فمثلاً استعمل Tsujisaka وآخرون (30) كلاً من مواد التفاعل الآتية : Laminarin و Laminari pentaose و Laminari tetraose و triose Laminari لإنتاج exo-β-1,3-Glucanase من *Basidiomycete spp.* .

المواد وطرائق العمل:

1- الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية :

تم قياس فعالية أنزيم السليوليز والسلوبابيز عند قيم مختلفة من الأس الهيدروجيني هي 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 باستخدام محلول منظم يحتوي على كلوريد البوتاسيوم وحامض الهيدروكلوريك، السترات والفوسفات، والترس Tris (hydroxymethyl) aminomethane Buffer ، ومحلول منظم الكاربونات-البيكاربونات بتركيز 0.2 مولاري . مزج كل من هذه المحاليل مع محلول مادة التفاعل (السليلوز) و (السلوبايوز) وقدرت الفعالية الأنزيمية بقياس السكريات المختزلة باستعمال كاشف DNS ، اما البروتين فقد قدر وفقاً لطريقة Lawry المحورة . تعرف وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم اللازمة لتحرير 1 مايكرومول من السكريات المختزلة في الساعة الواحدة تحت ظروف التجربة .

2- الأس الهيدروجيني الأمثل للثبات :

حضن كل من أنزيم السليوليز والسلوبابيز مع المحاليل المنظمة ذات القيم التالية من الأس الهيدروجيني 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10 والمحضرة كما في (1) لمدة نصف ساعة في أنابيب اختبار ووضعت هذه الأنابيب في حمام مائي بدرجة 35°م ثم بردت مباشرة في حمام ثلجي جرى بعدها تقدير الفعالية المتبقية لكل أنزيم .

3- الحرارة المثلى للفعالية وطاقة التنشيط :

تم تحديد الحرارة المثلى للفعالية وطاقة التنشيط لتحويل مادة التفاعل الى نواتج بقياس ثابت السرعة الملاحظ على مدى من درجات الحرارة 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60°م وحسبت E_a لكل أنزيم باستعمال معادلة ارينيوس $K=Ae^{-Ea}/RT$.

4- الثبات الحراري :

حضن كل من أنزيم السليوليز والسلوبابيز بدرجات حرارية مختلفة (20 ، 30 ، 40 ، 50 ، 60 و 70)°م عند

الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات ذلك الأنزيم ولمدة ساعة واحدة بعدها نقلت الأنابيب مباشرة الى حمام ثلجي ثم قيست الفعالية المتبقية لكل أنزيم .

5- ثابت ميكاليس والسرعة القصوى :

قدرت السرعة القصوى وثابت ميكاليس لأنزيمي السليوليز (BCl) والسلوبايز (BCb) النقيين باستخدام مواد تفاعل مختلفة وبتراكيز مختلفة ، فقد اختيرت مواد التفاعل السليلوز و CMC والقش المعامل بالبيروكسيد القاعدي لأنزيم السليوليز في حين اختيرت مواد التفاعل السلوبايوز وCMC لأنزيم السلوبابيز .

5-1- استخدام السليلوز كمادة تفاعل :

لغرض تحديد ثابت ميكاليس والسرعة القصوى حضر السليلوز مادة للتفاعل بالتراكيز 2500 و5000 و7500 و10000 و12000 و 15000 مايكروغرام/ مل وتم حساب قيم Km وVmax وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .

5-2- استخدام Carboxy Metyhl Cellulose (CMC) كمادة تفاعل :

استخدم CMC كمادة تفاعل لأنزيمي السليوليز والسلوبابيز وذلك بتحضير ما يسمى بالسكريات المتعددة السليلوزية غير الذائبة Insoluble cellooligosaccharide وذلك حسب طريقة Sakamoto وجماعته (26) . حضرت محاليل بتراكيز 312.5 و156.25 و78.125 و39 و625 و1250 مايكروغرام/ مل . تم حساب قيم Km وVmax وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk لكل أنزيم .

5-3- استخدام القش المعامل كمادة تفاعل :

استخدم قش الحنطة المعامل بالبيروكسيد القاعدي كمادة تفاعل لأنزيم السليوليز حيث حضر بتراكيز 2500 و5000 و7500 و10000 و12000 و 15000 مايكروغرام/ مل . تم حساب قيم Km وVmax وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .

5-4- استخدام السلوبايوز كمادة تفاعل :

لغرض تحديد ثابت ميكاليس والسرعة القصوى حضر السلوبايوز كمادة تفاعل بالتراكيز 2500 و5000 و7500 و10000 و12000 و 15000 مايكروغرام/ مل . تم حساب قيم Km وVmax لأنزيم السلوبابيز وفقاً لمعادلة Lineweaver-Burk (27) .

6- تقدير نقاوة الأنزيم بطريقة الترحيل الكهربائي :

اتبعت الطريقة المستخدمة من قبل Garfin (10) لتقدير نقاوة الأنزيم .

7- تقدير الوزن الجزيئي :

قدر الوزن الجزيئي لأنزيمي السليوليز (BCl) و السلوبابيز (BCb2) بطريقتين هما الترشيح الهلامي والترحيل الكهربائي .

8- تعيين نقطة التعادل الكهربائي (Isoelectric point) :

استخدمت طريقة التبئير الكهربائي الهلامي (Gel Electrofocusing) المتبعة من قبل Wrigley (36) لتعيين نقطة التعادل الكهربائي لأنزيمي السليوليز (BCl) و السلوبابيز (BCb2) والاستدلال على النقاوة .

9- تعيين نسبة الكاربوهيدرات :

تم تعيين نسبة الكاربوهيدرات في محلول أنزيمي السليوليز (BCl) و السلوبابيز (BCb2) بطريقة الفينول- حامض الكبريتيك والموصوفة من قبل Dubois وآخرون (9).

10- تشخيص الكاربوهيدرات الناتجة من فعل السليوليزات :

شخصت الكاربوهيدرات الناتجة من فعل كل من أنزيم السليوليز (BCl) وأنزيم السلوبابيز (BCb2) والتعرف على أنواع السكريات الناتجة وذلك باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الورقة Paper Chromatography (PC) و تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) .

النتائج والمناقشة

يلاحظ من شكل 1 الذي يمثل منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السليوليز BCl ، ان الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم كان 5.0 ويلاحظ الانخفاض التدريجي للفعالية على جانبي الأس الأمثل . لقد وجد Witkowska (35) أن الأس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم السليوليز المنتج من العفن *Trichoderma viride* هو 5.0 وسبقه Okada (23) في أنتاج انزيمي السليوليز من العفن نفسه وكان الاس الهيدروجيني لكلا

الانزيمين 4.5-5.0 . بينما ذكر Uchino و Nakane (31) ان الأس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم Xylanase الذي مصدره بكتريا *Bacillus spp.* كان 4.0 ، في حين ذكر Tavares وآخرون (28) ان افضل أس هيدروجيني لفعالية انزيم Xylanase المنتج من قبل *Bacillus spp.* كان 6.0 واحتفظ بمعدل 70% من فعاليته في الأس الهيدروجيني 9.0 .

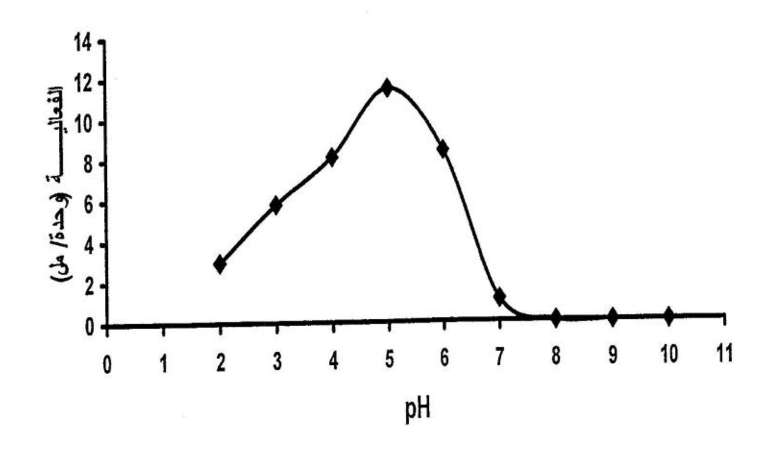
أما Tsujisaka وآخرون (30) فقد درسوا الأس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم exo-β-1,3-Glucanase إذ كان يساوي 5.8 ، وذكر Uziie وآخرون (32) انهم حصلوا على أعلى فعالية لانزيم β-xylosidase من الفطر *Chaetomium trilaterale* عند الأس الهيدروجيني 4.2 .

يشير Godfrey (11) الى ان اعلى الفعالية لمعظم السليوليزات الفطرية تكون عند الاس الهيدروجيني 5.0 او ان المعدل يكون ما بين 4-6 ، في حين تكون السليوليزات المنتجة من الخميرة اعلى فعالية لها عند الأس الهيدروجيني 7.0 ، ولتلك المنتجة من البكتريا تكون اعلى من 7.0 .

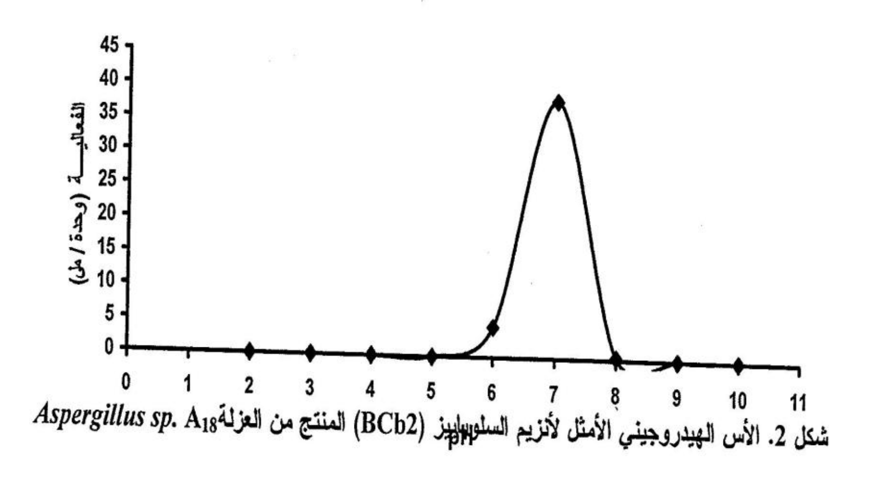
أشار باحث آخر (16) الى ان صورتي أنزيم السليوليز CelA وCelC أظهرتا أعلى فعالية عند مدى من الأس الهيدروجيني تراوح ما بين 4.3-6.8 بدرجة حرارة 50°م للأنزيم الأول ، وما بين 4.6-7.0 بدرجة 40°م للأنزيم الثاني .

يلاحظ من شكل 1 ان فعالية الانزيم عند القيمة المتعادلة 7.0 تكون منخفضة جداً وان الانزيم يعمل ضمن المدى الحامضي ، وهذا يعني احتمال وجود مجاميع الكاربوكسيل في الموضع الفعال للانزيم .

يمثل شكل 2 منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم السلوبابيز (BCb2) إذ يلاحظ ان اعلى فعالية لهذا الأنزيم كانت في الأس الهيدروجيني 7.0 وهذا يتفق مع ما ذكره Cai وآخرون (7) من ان أحدى صورتي الأنزيم β-glucosidase (BGL-I) المنتج من العرهون (Mushroom) الصالح للاستهلاك *Volvariella volacea*) قد أظهر أعلى فعالية له في الأس الهيدروجيني 7.0 ، بينما كان لأس الهيدروجيني الأمثل لفعالية الصورة الأخرى (BGL-II) 6.2 . ذكر Godfrey (11) ان أعلى فعالية للسلوبابيز المنتج من *A. niger* تكون في الأس الهيدروجيني 5.0 .



شكل 1. الأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم السليوليز (BCl)المنتج من العزلة A_{18} *Aspergillus sp.*

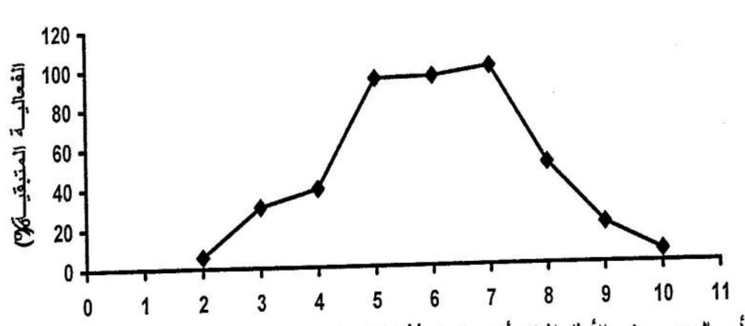


شكل 2. الأس الهيدروجيني الأمثل لأنزيم السلوبايز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}

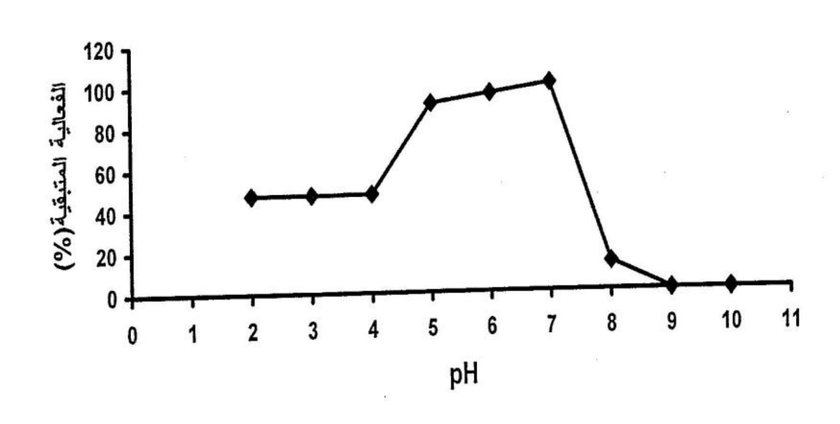
ان من بين الصفات المهمة جداً في تحديد ظـروف التنقية وخزن الأنزيم هي الأس الهيدروجيني الأمثـل لثبـات الأنزيم، ويلاحظ من الشكلين 3 و 4 والتي تمثل منحنى الأس الهيـدروجيني الأمثـل لثبـات أنزيمـي السـليوليز (BCl) والسلوبايز (BCb2) ان المدى الأمثل لثبـات الانـزيمين يتراوح ما بين 5.0-7.0 أي انهما يظهران ثباتاً واضحاً في الأوساط المتعادلة والحامضية القريبة من التعادل ، ويلاحـظ انخفاض الفعالية في الأوساط القاعدية فنجد ان أنزيم السليوليز (BCl) يحتفظ بنسبة 50% من فعاليته في (pH=8) في حين انخفضت فعالية أنزيم السلوبايز(BCb2) بنسبة 90% . لقـد وجد ان السليوليزات المنتجة من العفن *T. viride* تكون ثابتة فـي المـدى 5.0-7.0 (23) . كـذلك وجـد ان انزيمـات endoglucanases المنتجة من العفـن *T. viride* تظهـر أعلى فعالية في مدى الأس الهيدروجيني المحصور ما بـين 4.0-6.0 بينما تكون exoglucanases ثابتة في المدى مـا بين 5.0-6.0 (35) .

تختلف السليوليزات في مـدى ثباتهـا تجـاه الأس الهيدروجيني إذ يلاحظ من الدراسات سالفة الذكر ان المديات التي تبدي فيها الأنزيمات ثباتاً واضحاً لا تزيد على وحـدتين من الأس الهيدروجيني بينما ذكر Tsujisaka وآخرون (30) ان أنـــزيم exo-β-1,3-Glucanase المنـــتج مـــن *Basidiomycete spp.* قد أظهر ثباتاً في مدى كبير مـن الأس الهيدروجيني 5.1-9.8 . مـن جهـة أخـرى ذكـر Tavares وآخرون (28) ان أنزيم Xylanase المنتج مـن بكتريا *Bacillus spp.* يكون ثابتـاً في مدى واسـع مـن الأس الهيدروجيني يتراوح بين 5-10 .

تبدي الأنزيمات بصورة عامة حساسية معينة تجـاه التغيرات في درجات الحرارة وذلك من خلال تأثير الحـرارة في زيادة أو انخفاض الفعالية الأنزيمية ، ومن هذا المنطلـق أجريت تجربة لتحديد تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيمـي السليوليز والسلوبايز المنقاة قيـد الاختبـار وضـمن مـدى حراري تراوح بين 20-70°م . ويلاحظ من الشكل 5 الـذي يمثل منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السـليوليز (BCl) وازدياد الفعالية ما بعد 30°م بشكل حاد وملحوظ وان أفضل درجة حرارة لعمل هذا الأنزيم كانت عند 40°م حصل بعدها انخفاض تدريجي في الفعالية الأنزيمية حتـى 55-60°م ثـم اختفت بعدها تماماً . لقد وجـد ان أفضـل فعاليـة لأنـزيم endoglucanase المنتج من *Trichoderma viride* كانت ما بـين 30-40 °م بينمـا كانـت أعلـى فعاليـة لأنـزيم exoglucanase في درجة 40°م (35). فـي حـين ذكـر Okada (23) ان صورتي أنزيم السليوليز المنتج من العفـن *T. viride* تظهر أعلـى فعاليـة فـي 60°م . كـذلك بـين Sakamoto وآخرون (26) ان الفعالية الأنزيميـة لأنـزيم Hydrocellulase المنـــتج مـــن العفـــن *Aspergillus aculeatus* تكون أعلى ما يمكن في 60°م ، وقد أشير الى ان أعلى فعالية لأنـزيم Xylanase المنـتج مـن البكتريـا *Bacillus spp.* تكون في 60°م (28).



شكل 3. منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات أنزيم السليوليز (BCl) المنتج من العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}



شكل 4. منحنى الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات أنزيم السلوبايز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}

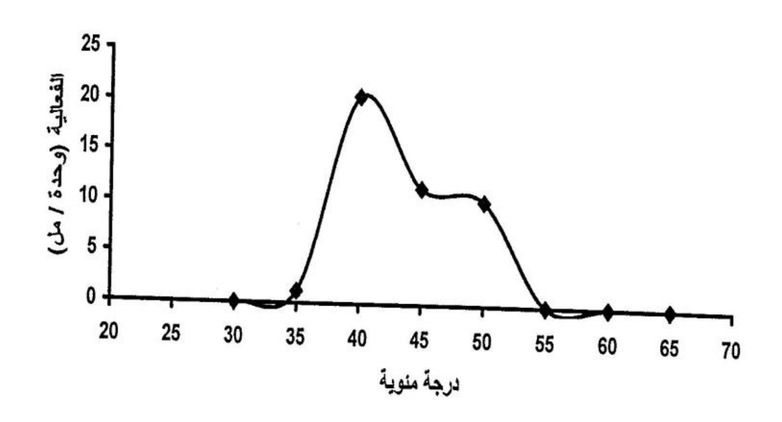
يوضح الشكل 6 منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السلوبايز (BCb2) إذ يمكن ملاحظة الارتفاع التدريجي في الفعالية الأنزيمية في 30°م ولغاية 50°م وهي أعلى قيمة تبلغها الفعالية تلاها انخفاض تدريجي لغاية 70°م تختفي بعدها. اما أنزيم السلوبايز المنتج من عفن *A. niger* ومعظم أنزيمات β-glucosidase الفطرية فانها تبدي أقصى فعالية لها في درجة 60°م (11).

يعبر عادة عن تأثير الحرارة في التفاعلات المحفزة من قبل الأنزيمات بدلالة طاقة التنشيط (Activation energy) وهي أقل طاقة يحتاجها التفاعل لكي يبدأ ويرمز لها Ea . تم حساب طاقة التنشيط لتحويل السليلوز الى كلوكوز بفعل أنزيمي السليوليز والسلوبايز من العزلة A_{18} قيد الاختبار ، وفقاً لمعادلة ارينيوس إذ تم الحصول على منحنى ارينيوس لأنزيم السليوليز (BCl) في الشكل 7 وأنزيم السلوبايز (BCb2) (الشكل 8) والذي يمثل العلاقة بين لوغارتم ثابت السرعة (Log K) ومقلوب درجة الحرارة المطلقة (T/1) ، إذ بلغت طاقة التنشيط لأنزيم السليوليز والسلوبايز 11.385 و 8.147 كيلوسعرة/ مول ، على الترتيب. تقع هذه القيم لطاقة التنشيط ضمن المدى الذي ذكره Whitaker (34) لمعظم الأنزيمات والذي يتراوح ما بين

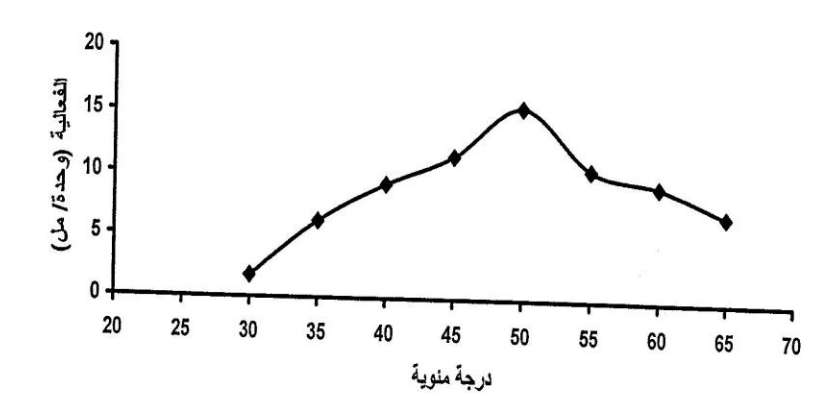
15-6 كيلوسعرة/ مول. ذكر Miyairi وآخـرون (19) ان طاقـة التنشيـط لأنـزيم β-glucosidase كانـت 11.1 كيلوسعرة/ مول.

أشار Abdel-Naby (2) الى ان طاقـة التنشـيط لأنزيم السلوباييز المنتج من العفن *A. niger* كانت حـوالي 10.5 كيلوسعرة/ مول ، في حين بين Calsavara وآخرون (8) ان طاقة التنشيط لأنزيم السلوباييز كانت 11 كيلوسعرة/ مول. اما بالنسبة لأنـزيم Xylanase المنـتج مـن العفـن *Aspergillus tamarii* فقد كانت 15.22 كيلوسعرة/ مول (12).

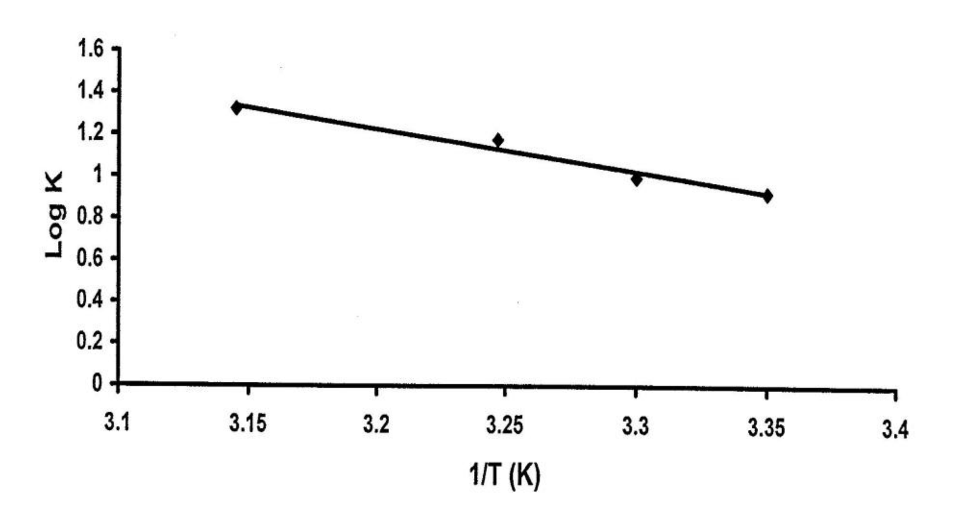
مما تقدم يمكن الاسـتنتاج ان السـلوباييز (BCb2) المنتج من العزلة A18 قيد الاختبار يمكنه العمل فـي درجـة حرارة أعلى من أنزيم السليوليز (BCl) ، وبالنتيجـة فانـه يحتاج الى طاقة أقل لاستئناف الفعل الحفزي له.



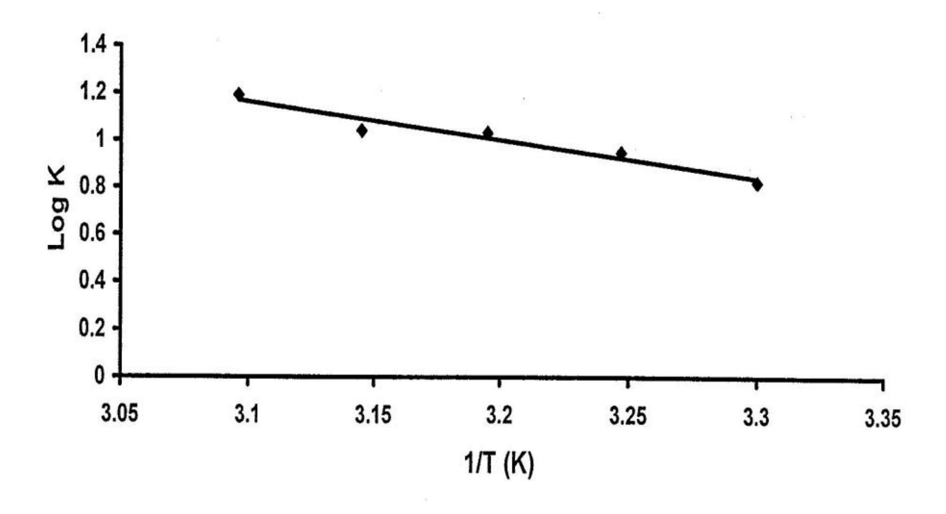
شكل 5. منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السليوليز (BCl) المنتج من العزلة A18 *Aspergillus sp.*



شكل 6. منحنى درجة الحرارة المثلى لأنزيم السلوباييز (BCb2) المنتج من العزلة A18 *Aspergillus sp.*



شكل 7. منحنى طاقة التنشيط لأنزيم السليوليز (BCl) المنتج من
العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}



شكل 8. منحنى طاقة التنشيط لأنزيم السلوبابيز (BCb2) المنتج من
العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}

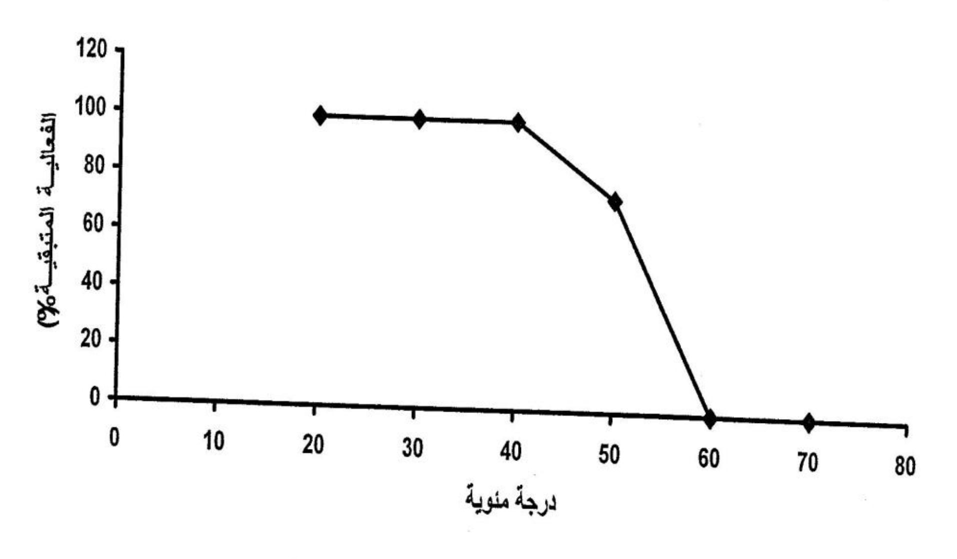
يعد الثبات الحراري من بين العوامل المهمة التي يمكن عن طريقها تحديد درجات الحرارة التي يحتفظ فيها الأنزيم بفعاليته ونشاطه وتلك التي تؤثر فيه سلباً ، ويتم على ضوئها اختيار درجات الحرارة الملائمة لاستعمال الأنزيم في التطبيقات العملية . وأجريت هذه الدراسة بحضن كل من محلول أنزيم السليوليز ومحلول أنزيم السلوبابيز بشكل مستقل في الأس الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم وفي درجات حرارية مختلفة ولوقت محدد.

يلاحظ من الشكل 9 الذي يمثل الثبات الحراري لأنزيم السليوليز (BCl)، والشكل (10) الذي يمثل منحنى الثبات الحراري لأنزيم السلوبابيز (BCb2) . ان الأنزيم الأول يظهر ثباتاً واضحاً في درجة 40°م ولمدة 60 دقيقة

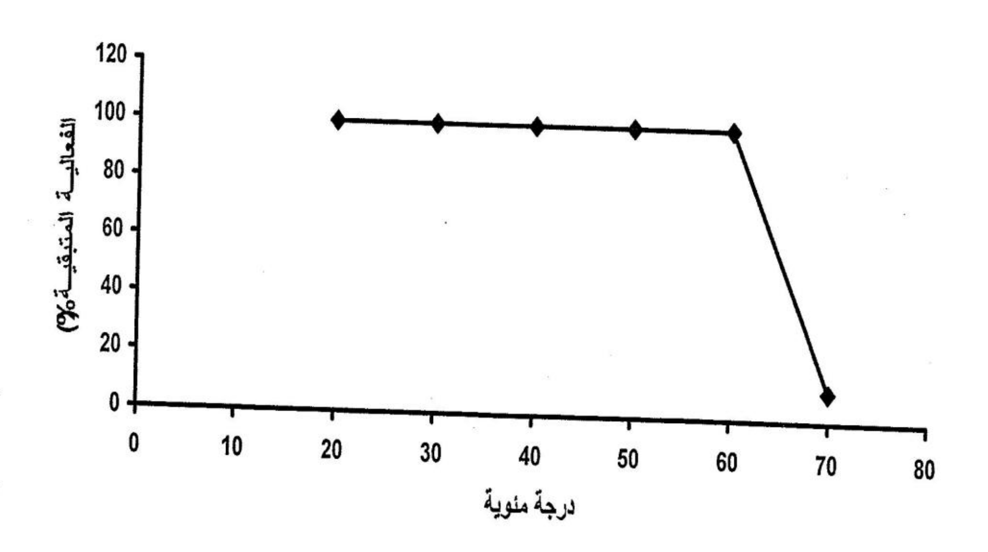
ويحتفظ بحوالي 73% من فعاليته في درجة حـرارة 50°م ، في حين يبدي السلوبابيز ثباتاً متميزاً في درجة حرارة 60°م لمدة 60 دقيقة ويفقد 90% من فعاليته في درجة حرارة 70°م .

لقد وجد ان أنزيم β-glucosidase يحتفظ بحـوالي 80% من فعاليته في درجة 50°م (19). ووجـد ان أنـزيم Hydrocellulase المنتج من العفن *A. aculeatus* يكـون ثابتاً في درجات حرارة أقل من 50°م (26) .

حصل Calsavara وآخرون (8) على نتائج مماثلة لنتائج الدراسة الحالية إذ كان أنزيم السلوبابيز (Novozym 188) يبقى ثابتاً في درجة حـرارة 60°م . تبقـى فعاليـة السليوليزات في شطر سكر β-glucan ثابتة ومستمرة لغايـة درجة الحرارة 60°م (37) .



شكل 9. منحنى الثبات الحراري لأنزيم السليوليز (BCl) المنتج من العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}



شكل 10. منحنى الثبات الحراري لأنزيم السلوبابيز (BCb2) المنتج من العزلة *Aspergillus sp.* A_{18}

جرى تعيين ثابت ميكاليس Km والسرعة القصوى Vmax لأنزيم السليوليز (BCl) باستخدام مواد التفاعل المتمثلة بالسليلوز و CMC المعامل والقش المعامل ، وباتباع طريقة Lineweaver-Burk (27) لرسم العلاقة بين مقلوب تركيز مادة التفاعل ومقلوب السرعة والتي أفرزت المنحنيات الخاصة بكل مادة تفاعل (الأشكال 11 و 12 و 13) وتظهر النتائج ان قيم Km لأنزيم السليوليز (BCl) كانت 4 ، 0.8 و 0.33 ملغم لكل من السليلوز وCMC المعامل والقش المعامل على الترتيب.

ان Km هي أحد الثوابت المميزة للأنزيم ومادة التفاعل حيث تختلف باختلاف الأنزيم، مصدره وطبيعة مادة التفاعل المستعملة (27) . على ضوء قيم Km المؤشرة أعلاه يكون القش المعامل هو مادة التفاعل الأكثر ملاءمة من بين المواد المستخدمة للسليوليز المنتج من العزلة A_{18} قيد الاختبار ، وفي تجربة منفصلة استعمل فيها CMC غير المعامل لم تؤشر النتائج أي فعالية لهذا الأنزيم تجاه CMC غير المعامل وقد يعزى هذا الى وجود مجاميع الكاربوكسيل التي تعد مثبطاً للفعالية الأنزيمية لذلك تم اللجوء الى معاملة CMC لجعلها أقل ذائبية (Insoluble cellooligosaccharides) لتسهيل مهمة أنزيمات (Hydrocellulases) وقيامها بالفعل المطلوب (26).

ذكر Tsujisaka وآخرون (30) ان قيم Km لأنزيم exo-β-1,3-Glucanase من *Basidiomycete spp.* باستخدام مواد التفاعل Laminarin ، Laminaripentaose ، Laminaritetraose و Laminaritriose هي 0.16 و 2.01 و 2.24 و 1.34 ملي مول على الترتيب . أما Tong (29) فقد عزل مجموعة أعفان نوع *Aspergillus spp.* ووجد أن ثلاثة منها كانت منتجة للسليوليز وعند استخدامه لورق الترشيح كمادة تفاعل لاحظ ان هذه الأنزيمات الثلاثة المنتجة تمتلك قيم Km مختلفة ، إذ بلغت قيمة Km للأنزيم الأول 40 ملغم/مل ، والثاني 25 ملغم/مل ، اما الثالث فقد كانت قيمة Km له تساوي 28.6 ملغم/مل . وقد أشار Busto وآخرون (6) الى ان قيمة Km لأنزيم endo-Beta-glucanase المنتج من *T. reesei* تساوي 1.31%. اما بخصوص السليوليز المنتج من بكتريا *Clostridium thermocellum* فقد كانت قيمة Km له 0.61 ملي مول (37).

اما بخصوص قيمة Vmax لأنزيم السليوليز قيد الدراسة فيبين الجدول 2 الى ان هذا الأنزيم يمتلك أعلى سرعة عند استخدام السليلوز كمادة تفاعل إذ بلغت 41.66 مايكرومول/ساعة مقارنة بـ 20 مايكرومول/ساعة عند استخدام CMC المعامل كمادة تفاعل و10 مايكرومول/ساعة للقش المعامل .

أشار Tong (29) الى ان السليوليزات المنتجة من ثلاثة أنواع لعفن Aspergillus تختلف في سرعتها القصوى (Vmax) إذ بلغت السرعة القصوى لأحدها 13.33 وحدة/ملغم بروتين ، وللأخر 8.33 وحدة/ملغم بروتين ، في حين كانت السرعة القصوى للثالث 11.11 وحدة/ملغم بروتين. اما Busto وآخرون (6) فقد ذكر ان أنزيم endo-Beta-glucanase المنتج من *T. reesei* يمتلك Vmax تقدر بـ 40.3 مايكرومول/مل .

اما قيم Km للسلوبايز باستخدام السلوبايوز وCMC المعامل كمواد تفاعل هي 7.69 ملغم و 0.28 ملغم على الترتيب ، وقيم Vmax 57.14 مايكرومول/ساعة و16.66 مايكرومول/ساعة باستعمال السلوبايوز و CMC المعامل. وهذا يعني ان مادة CMC الأكثر ملاءمة للسلوبابيز قيد الدراسة ، وبما ان CMC المعامل هو Cellooligosaccharide ويتكون من سلسلة طويلة لجزيئات الكلوكوز المرتبطة بآصرة (β) يمكن الاستدلال على ان السلوبابيز المنتج من العزلة A_{18} هو نوع Hydrocellulases وتحديداً β-glucosidase.

وجد Bissett و Sternberg (5) في دراستهما ان قيمة Km لأنزيم β-glucosidase المنتج من من عفن Aspergillus بلغت 5 ملي مول ، و Vmax 0.06 مايكرومول/دقيقة . اما Zhang و Lynd (37) فقد ذكر ان قيمة Km لأنزيم cellobiase من *Clostridium thermocellum* قد بلغت 3.3 ملي مول ، بينما Vmax له فكانت 0.5 ملي مول/مل .

جدول 2. قيم Km و Vmax للسليوليز (BCl) والسلوبابيز (BCb2) قيد الدراسة باستخدام مواد تفاعل مختلفة

مادة التفاعل	السليوليز BCl Km ملغم	السليوليز BCl Vmax مايكرومول/ساعة	السلوبابيز BCb2 Km ملغم	السلوبابيز BCb2 Vmax مايكرومول/ساعة
السليلوز	4	41.66	–	–
السلوبايوز	–	–	7.69	57.14
CMC المعامل	0.8	20	0.28	16.66
القش المعامل	0.33	10	–	–

نقاوة الأنزيم :

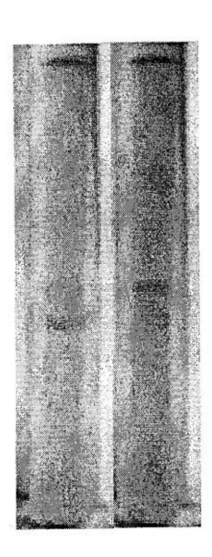
أظهر ترحيل الأنزيم المنقى علـى هـلام البـولي اكريلامايد وجود حزمة واحدة لكل مـن السـليوليز (BCl) والسلوبابيز (BCb2) (شكل 11) ، وهذا دلالة علـى تنقيـة الأنزيم لغاية التجـانس (Homogeniety) . يلاحـظ عنـد استخدام 2-mercaptoethanol الى جانـب SDS لتحطـيم البروتين ظهور حـزمتين متقـاربتين مـن بعضـهما لكـلا الأنزيمين (شكل 12) وقد يدل هذا على ان الأنزيمين ربمـا يتكونان من سلسلتين من السلاسل البروتينية المرتبطـة مـع بعضها بوساطة الأواصر الثنائية الكبريتيد (S-S) .

نقطة التعادل الكهربائي PI :

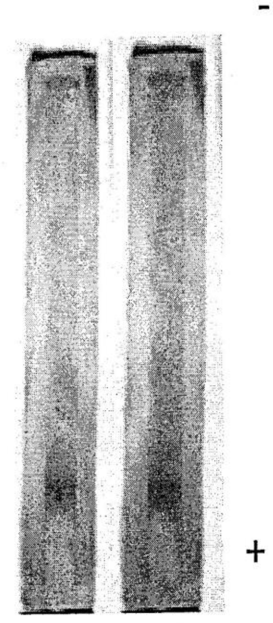
يلاحظ من الشكل 13 ظهور حزمة واحدة واضـحة من البروتين لكل أنزيم وهذا دليل آخر على نقاوة الأنـزيم . ويظهر الشكل 14 وجود فعالية أنزيمية للسليوليز (BCl) عند الأس الهيدروجيني 3.6 (القطعة 17) من الهـلام ، وكـذلك وجـود فعاليـة أنزيميـة للسـلوبابيز (BCb2) عنـد الأس الهيدروجيني 4.2 (القطعة 15) من الهلام عند قياس الفعاليـة الأنزيمية لكليهما .

ان وجود حزمة واحدة في القطعة المماثلـة للهـلام الآخر يشير الى ان حركة الأنزيم أصبحت صفراً في المجال الكهربائي ، بمعنى آخر ان محصلة الشحنات التـي تحملهـا تساوي صفراً عند الأس الهيدروجيني المذكور لكل أنـزيم . بعبارة أخرى فإن هذا الأس الهيدروجيني هو قيمة PI للأنزيم . لقد وجد Murao و Sakamoto (21) ان نقطـة التعـادل الكهربائي لأنزيم Hydrocellulase المنـتج مـن العفـن *Aspergillus aculeatus* كانت تساوي 3.5 ، وفي تجربة أخرى بهـذا الخصوص ذكـر Murao و Sakamoto (22) ان تنقيـة أنزيـم β-glucosidase المنتج مـن العفـن *Aspergillus aculeatus* أظهرت ثلاث صـور أنزيميـة (1،2،3) من β-glucosidase وعند قياس PI كانت لكـل منها 4.7 و 4.3 و 3.6 علـى الترتيـب . فـي حـين بـين Tsujisaka وآخـرون (30) ان نقطـة التعـادل الكهربـائـي لأنـزيـم exo-β-1,3-glucosidase المنتج من *Basidiomycete spp.* تبلغ 9.2 .

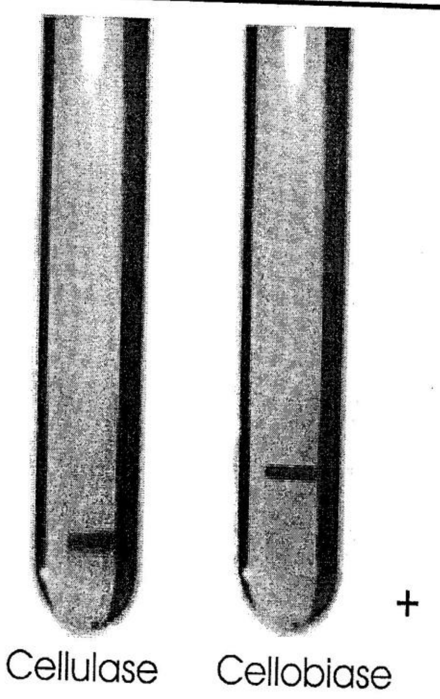
اما Uziie وآخرون (32) فقد أشار الـى نقطـة التعـادل الكهربـائـي لأنـزيم β-xylosidase المنتـج مـن العفـن *Chaetomium trilaterale* كانـت 4.86 . في حيـن ذكـر Mansfield وآخـرون (18) ان أنزيمـي endoglucanase (EGS و EGT) المنتجة مـن العفـن *Gloeophyllum sepiarium* يمتلكان نقطة تعادل كهربائي هما 3.8 و 3.1 على الترتيب .



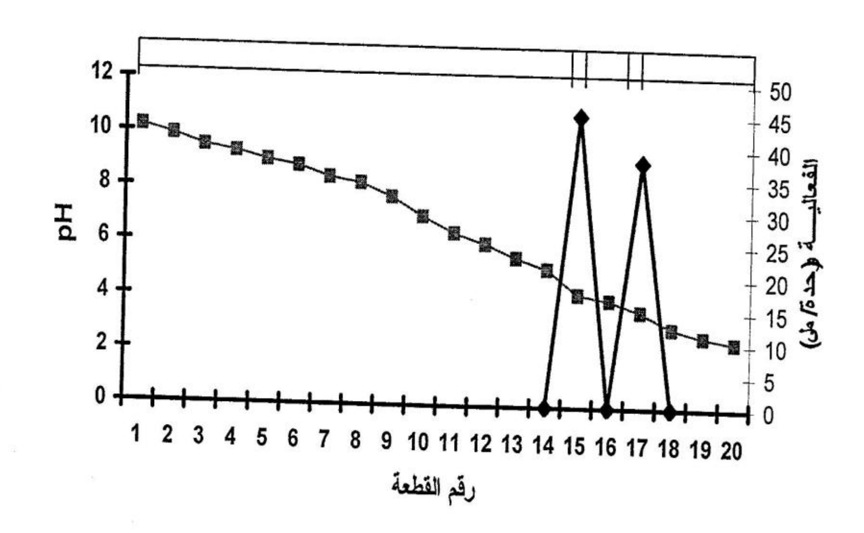
شكل 11. الترحيل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوبايز BCb2



شكل 12. الترحيل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوبايز BCb2 باستخدام 2-mercaptoethanol



شكل 13. حركة أنزيمي السليوليز BCl والسلوبايز BCb2 في هلام تقدير نقطة التعادل الكهربائي بطريقة Isoelectric focusing



شكل 14. تقدير نقطة التعادل الكهربائي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوبايز BCb2 المنتجين من العزلة A_{18} لتقدير نقطة التعادل الكهربائي بطريقة Isoelectric focusing

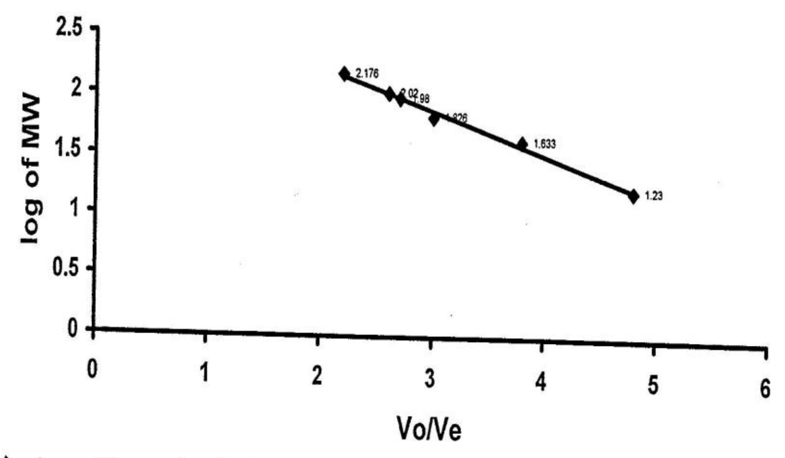
تقدير الوزن الجزيئي :

اتبعت طريقتان لتقدير الوزن الجزيئي للسليوليز BCl والسلوبايز BCb2 ، كانت الأولى باستخدام عمود الترشيح الهلامي نوع Sephadex G-200 ، كان يساوي 104 كيلودالتون للسليوليز BCl و 95 كيلودالتون للسلوبايز BCb2 (الشكل 15) . حصل Murao و Sakamoto (21) باستخدام طريقة الترشيح الهلامي ، على وزن جزيئي يساوي68 كيلودالتون لأنزيم Hydrocellulase المنتج من العفن *Aspergillus aculeatus*، اما Uziie وآخرون (32) فقد ذكروا ان الوزن الجزيئي لأنزيم β-xylosidase المنتج من *Chaetomium trilaterale* والمعين بطريقة الترشيح الهلامي (Sephadex G-200) كان يساوي ما يقارب 240 كيلودالتون. وقد قدر الوزن الجزيئي لأنزيم exo-β-1,3-Glucanase المنتج من .Basidiomycete spp المحدد بالترشيح الهلامي (Sephadex G-200) إذ بلغ 73 كيودالتون (30) . أما Cai وآخرون (7) فقد ذكروا ان الوزن الجزيئي لأنزيمي (BGL-I) و (BGL-II) المنتجة من العرهون والذي حدد بوساطة الترشيح الهلامي (Sephacryl S-200) بلغ 158 كيلودالتون و 256 كيلودالتون على الترتيب . أما Mansfield وآخرون (18) فقد ذكروا ان صورتي أنزيم endoglucanases (EGS و EGT) المنتجة من العفن *Gieophyllum sepiarium* تتماثلان في وزنها الجزيئي المحدد باستعمال الترشيح الهلامي والذي بلغ 45.1 و 45.0 كيلودالتون ، على الترتيب .

وكانت الطريقة الثانية لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيمين قيد الدراسة (BCl و BCb2) باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي على هلام البولي اكريلامايد الحاوي على SDS (الشكل 16) . ومن العلاقة الخطية بين الحركة النسبية لهذه البروتينات ولوغارتم وزنها الجزيئي (الشكل 17) أمكن تقدير الوزن الجزيئي للسليوليز والسلوبايز من خلال تقدير الحركة النسبية لهما إذ بلغ 81.28 و 72.44 كيلودالتون ، على الترتيب .

مما تقدم يتضح ان استخدام تقنيات مختلفة لتقدير الوزن الجزيئي لبروتين معين ينتج عنها اختلاف في القمم المستحصلة وقد يكون مرد ذلك الى الاختلافات في محتوى البروتين من الكاربوهيدرات الذي ينعكس بدوره على اضفاء وزن جزيئي الى البروتين يكون أكبر من الواقع وذلك باستخدام تقنية الترشيح الهلامي إذ يحاط البروتين بعدد كبير من جزيئات الماء مقارنة مع البروتينات الأخرى التي تخلو من أي جزء كاربوهيدراتي من جانب آخر فان الاختلاف الناتج في قيمة الوزن الجزيئي للبروتين ذاته عند تقديره بتقنية الترحيل الكهربائي وبوجود SDS ربما يعود الى انخفاض نسبة ارتباط جزيئات SDS بالبروتين عند الترحيل لاحتوائه على جزء كاربوهيدراتي مؤدياً بذلك الى انخفاض نسبة الشحنة / الكتلة ثم تقليل حركته ليظهر البروتين بوزن جزيئي أكبر مما هو عليه في الحقيقة علماً ان حركة البروتينات في الهلام تتناسب عكسياً مع لوغارتم الوزن الجزيئي (1) وقد ينسب ذلك الى سبب آخر.

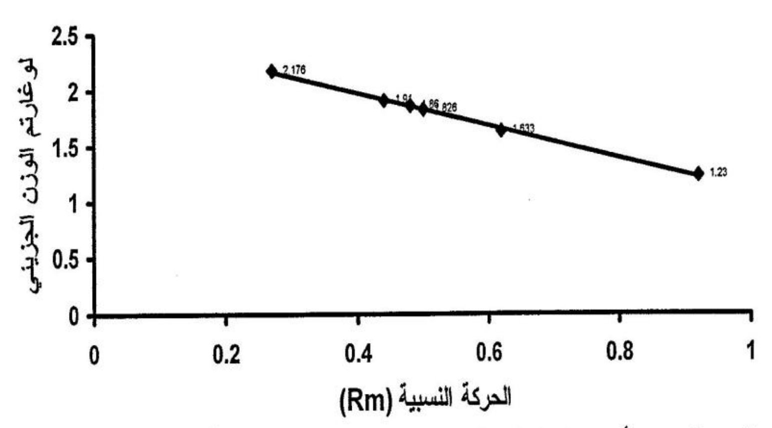
لقد وضح Kim وآخرون (14) ان مجموعة السليوليزات من العفن *Trichoderma viride* التي تحتوي على أربع صور أنزيمية endoglucanase I و II وIII وIV وأنزيم واحد نوع exoglucanase قدر الوزن الجزيئي لها باستعمال الترحيل الكهربائي فكان 52 و 60 و 42 و 38 و62 كيلودالتون ، على الترتيب . لقد قدر الوزن الجزيئي لأنزيم beta-xylosidase من العفن *Termitomyces clypeatus* بالترحيل الكهربائي إذ بلغ 190 كيلودالتون (4) .



شكل 15. منحنى تقدير الوزن الجزيئي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوبايز BCb2 من العزلة A_{18} *Aspergillus sp.* بطريقة الترشيح الهلامي (Sephadex G-200)



شكل 16. تقدير الوزن الجزيئي بالترحيل الكهربائي بطريقة
Disc gel electrophoresis



شكل 17. منحنى تقدير الوزن الجزيئي لأنزيمي السليوليز BCl والسلوباييز BCb2 من العزلة A_{18} *Aspergillus sp.* بطريقة الترحيل الكهربائي

SDS-Disc gel electrophoresis

تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي للسليوليزات :

جرى تقدير نسبة الكاربوهيدرات الكلية في السليوليز (BCl) والسلوباييز (BCb2) بطريقة الفينول-حامض الكبريتيك والموصوفة من قبل Dubois وآخرون (9) ، وأظهرت النتائج ان أنزيم السليوليز النقي المنتج من العزلة A_{18} كان خالياً من الكاربوهيدرات بينما يحتوي أنزيم السلوباييز (BCb2) على 13.7% من الكاربوهيدرات . ان احتواء أنزيم السلوباييز على هذه النسبة من الكاربوهيدرات يفسر الفرق في الوزن الجزيئي بين الأنزيمين قيد الاختبار وكذلك مقاومة أنزيم الساوباييز للحرارة إذ أظهر ثباتاً حرارياً لغاية 70°م .

لقد ذكر Okada (23) ان صورتي أنزيم السليوليز (II-A و II-B) المنتجة من العفن *T. viride* يحتويان على 12-14% كاربوهيدرات ككلوكوز. ووجد ان أنزيم β-xylosidase المنتج من العفن *Chaetomium trilaterale* يحتوي 20.7% كاربوهيدرات بشكل كلوكوز . (32)

أوضح Väljamäe (33) ان أنزيم Cellobiohydrolase (CBH I) أحد أنزيمات *T. reesei* هو عبارة عن glycoprotein يحتوي على 6% من الكاربوهيدرات ، وان الجزء الكاربوهيدراتي موجود في الطرف الكاربوكسيلي للسلسلة البروتينية . اما بالنسبة لأنزيم endoglucanase (EG III) وهو أيضاً ينتج من العفن *T. reesei* يكون خالياً من الكاربوهيدرات ويعتقد انه هو الذي يبدأ بالعمل على تحليل السليلوز ولم تعرف آلية هذا النوع من الأنزيمات بعد (13) . أكد Lynd وآخرون (17) أهمية الجزء الكاربوهيدراتي الموجود في جزيئة الأنزيم والتي تدعى Carbohydrate Binding Modules (CBMs) إذ يرتبط هذا الجزء بسطح السليلوز ويساعد على تحليله عاملاً على توجيه المجموعة المحللة لتكون قريبة الى مادة التفاعل الممثلة بالسليلوز غير الذائب ، وان وجود (CBMs) يكون ذا أهمية خصوصاً لأنزيمات exoglucanase لبدء عملها .

تشخيص السكريات الناتجة بفعل السليوليزات قيد الدراسة :

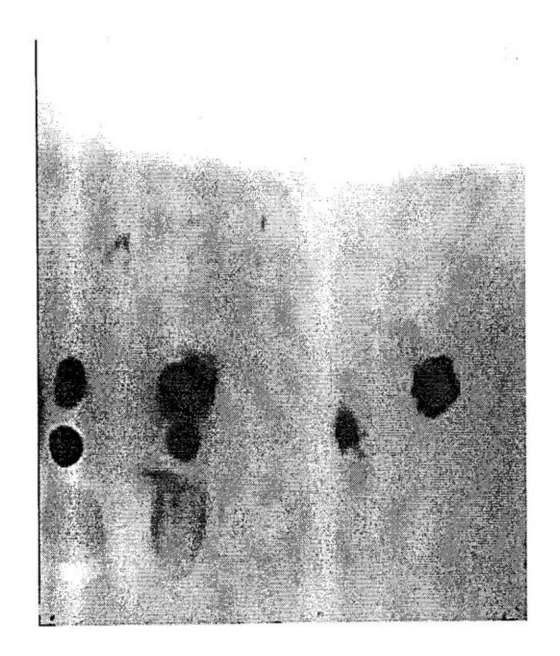
جرى تشخيص الكاربوهيدرات الناتجة من فعل السليوليز (BCl) والسلوباييز (BCb2) المنتجين من العزلة A_{18} بطريقتين كانت الأولى كروماتوكرافيا الورقة Paper Chromatography (PC) والثانية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) . يلاحظ من الشكل (18-أ) والذي يمثل نتائج فصل نواتج تفاعل أنزيم السليوليز الخام والنقي على مادة السليلوز بطريقة (PC) ، والتي تظهر ان السليوليز الخام يعمل على تكوين الكلوكوز والسلوبايوز وذلك من خلال تماثل قيم R_f النواتج مع R_f السكريات القياسية (الكلوكوز والسلوبايوز) . اماالأنزيم النقي فيحرر السلوبايوز بكمية أكثر من الكلوكوز ،

إذ يقوم هذا الأنزيم بتكوين السلوبايوز كخطوة أولى في تحليل السليلوز فضلاً على تكوين كمية من الكلوكوز وتؤدي الزيادة في تركيز السلوبايوز الى تثبيط الأنـزيم وقـد يفسـر هـذا انخفاض الفعالية بعد 48 ساعة ، ويلاحظ من الشـكل ذاتـه وجـود سـكريات أخـرى قـد تكـون cellotriose و celltetrose والتي تتكون نتيجة عمل أنزيم السليوليز (BCI) على مادة السليلوز.

تظهر نتائج البحوث الأخيـرة المتعلقـة بأنزيمـات endoglucanases النقية والعائدة لأنظمة سليوليزية عديدة ، ان قابلية هذه الأنزيمات في تحطيم السليلوز المتبلور تـرتبط بقابليتها في تكوين الكلوكوز كناتج ذائب نتيجة لعملية التحلـل (15) ، فكلما كان الفعل الأنزيمي عشوائياً وبدرجة كبيـرة ، كلما انخفض فعل الأنزيم في تحليل السليلوز المتبلور ومن ثم خفض كمية الكلوكوز المتكون (Int:1) ، وهذا يطابق فعـل أنزيم السليوليز النقي (BCI) قيد الاختبار إذ يلاحـظ تكـون الكلوكوز بنسبة قليلة مقارنة بالسلوبايوز، وهذا يدلل علـى ان الأنزيم ذو فعل عشوائي وبدرجة كبيرة وهذا مؤشر آخر على كون أنزيم (BCI) المنتج من العزلة A_{18} هـو مـن نـوع endoglucanase . وأظهرت طريقة الفصل الثانية (TLC) نتائج مماثلة (الشكل 19) إذ يلاحظ ان نسبة الكلوكوز الناتجة كانت قليلة جداً ومتداخلة مع السليلوز وذلك لتقارب قيمـة R_f للكلوكوز مع قيمة R_f للسليلوز ، ويمكن التأكيد هنا علـى ان الأنزيم من نوع endoglucanase بسبب فعلـه العشـوائي الذي ينتج عنه السلوبايوز وقليلاً من الكلوكوز . ذكر كل من Philippidis وآخرون (25) و Mosier وآخرون (20) في دراساتهم على السليوليز المنتج من بكتريـا *Clostridium thermocellum* وعفن *Trichoderma spp.* ان تحليـل السليلوز يثبط بوساطة السليبايوز الناتج وبدرجة أقل بوساطة الكلوكوز.

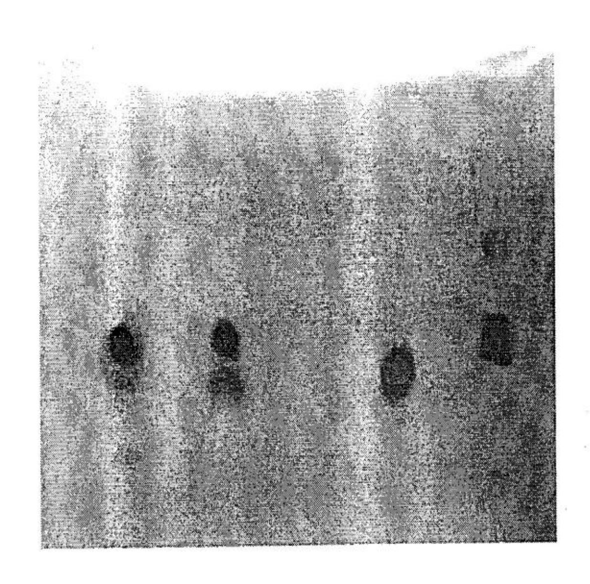
اما الشكل (18-ب) فيمثل نتائج فصل نواتج تحليل السلوبايوز بوساطة السلوبابيز الخام والنقي بطريقـة (PC) ، إذ يمكن ملاحظة تكون الكلوكوز بشكل واضح فضلاً عن بقاء جزء من السلوبايوز لعدم اكتمال التحليل ، ويمثل الشكل (24) نواتج تحليل السلوبايوز بطريقة (TLC) إذ يمكـن ملاحظـة تكون الكلوكوز من السلوبايوز.

استخدم Tsujisaka وآخرون (30) كروماتوكرافي الورق لفصـل نـواتج تحليـل Laminarin ، Curdlan و Sclerglucan بوساطة أنزيم exo-β-1,3-Glucanase ، وأظهرت النتائج ان معظم المواد الناتجة هـي كلوكـوز وان نسبة تحليل Laminarin كانت تمثل أكثر مـن 90% وفـي حالة استعمال Scleroglucan كانت النواتج تحتـوي علـى الكلوكـوز والجنتيوبـايوز gentiobiose . امـا Uchino وNakane (31) فقد استخدما كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقـة (TLC) باستخدام طبقات رقيقة نوع (Avicel SF) لفصـل نواتج تحليل الزايلان بوساطة أنزيم Xylanase المنتج مـن البكتريا *Bacillus spp.* فظهرت النواتج المفصولة على انها تمثل الزايلوبايوز X_2 والزايلوترايوز X_3 والزايلوتيتروز .



كلوكوز سلوبايوز سليلوز سليوليز خام سليوليز نقي

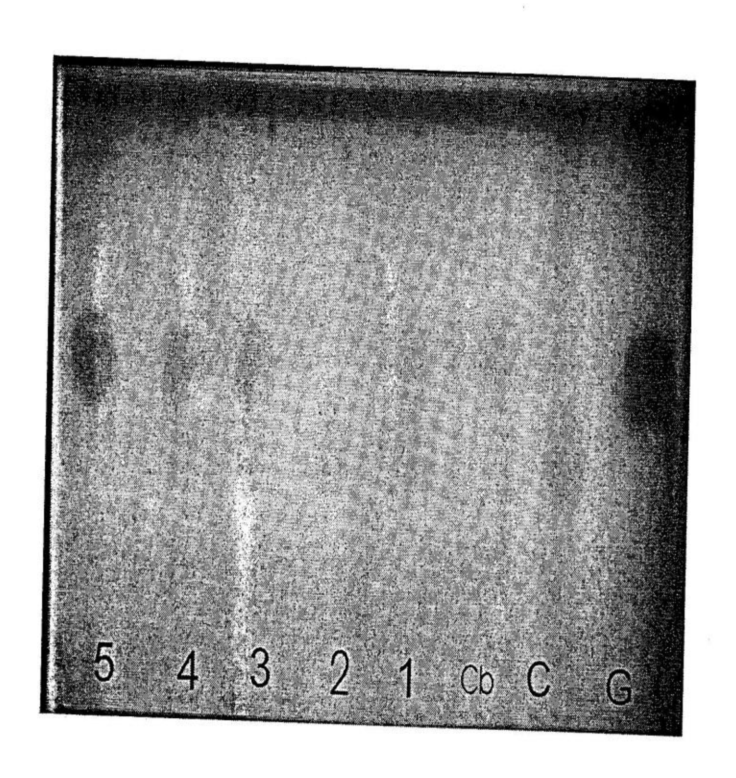
شكل 18-أ. فصل نواتج تفاعل السليوليز الخام والنقي على مادة السليلوز بطريقة (PC)



كلوكوز سلوبايوز سليلوز سلوباييز خام سلوباييز نقي

شكل 18-ب. فصل نواتج تفاعل السلوباييز الخام والنقي على مادة السلوبايوز بطريقة (PC)

أشـــار Peiris و Silva (24) الـــى اســـتخدام كروماتوكرافي الورق للسليوليزات المنتجة مـــن العفـــن *T. reesei* ، إذ أظهرت النتائج ان نواتج تحليل قش الرز بهـــذه الأنزيمات تشتمل على الكلوكوز بشكل رئيسي ، والزايلـــوز والسلوبايوز. وأوضح Lynd وآخـــرون (17) أنـــه يتطلـــب انتـــاج نوعيـــن في الأقـــل من أنـــزيمات β-glucosidase من العفن *T. reesei* لكي يساعد ذلك على تحليل السلوبايوز والسكريات المتعددة الصغيرة الى كلوكوز ، حيث تم عـــزل أنزيمين هما BCl I و BCl II من راشح المزرعة الفطرية.



شكل 19. فصل نواتج تفاعل السليوليز والسلوباييز الخام والنقي بطريقة (TLC)

G = كلوكوز قياسي ، C = سليلوز قياسي ، Cb = سلوبايوز قياسي ، 1= نواتج تفاعل المستخلص الخام على السليلوز ، 2 = نواتج تفاعل السليوليز النقي(BCl) على السليلوز، 3 = نواتج تفاعل المستخلص الخام علىالسلوبايوز ، 4 = نواتج تفاعل السلوباييز النقي (BCb2) على السلوبايوز ، 5 = السكر المتبلور المنتج من القش المعامل

ا

لمصادر

1- عمران ، محفوظة عباس .1997 . تنقية وتوصيف أنزيم بيروكسيديز سعف النخيل . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة بغداد .

2- Abdel-Naby, M.A.1999. Stabilization of cellobiase by covalent coupling to soluble polysaccharide. Microbiol. Res.,154 (2):213-218.

3- Akinyosoye, F.A., D.J. Arotupin and J.A. Akinyanju.1995. Cellulolytic activity at a fresh isolate of *Aspergillus niger* from Sawdust. Bioscience Research Communications, 7 (1):25-29.

4- Bhattacharyya,S., S. Khowala, A. Kumar and S. Sengupta.1997. Purification and characterization of an extracellular bet-

15- Klyosov, A.A.1990.Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry, 29:10577-10585.
16- Li X.L., H.Z. Chen and L.G. Ljungdahl.1997.Two cellulases, Cel A and Cel C, from the polycentric anaerobic fungus Orpiomyces Strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. Appl. Environ. Microbiol.,63 (12):4721-4728.
17- Lynd,L.R., P.J. Weimer, W.H. Vanzyl and I.S. Preforius.2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 (3):506-577.
18- Mansfield, S.D., J.N. Saddler, and G.M. Gubitz.1998. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. Enzyme of Microbial Technology, 23 (1-2): 133-140.
19- Miyairi, S., M. Sugiura and S. Fukui.1978.Immobilization of β- glucosidase in fibroin membrane. Agric. Biol. Chem., 42 (9): 1661-1667.
20- Mosier,N.S., P. Hall, C.M. Ladisch and M.R. Ladisch.1999. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 65: 23-40.
21- Murao,S. and R. Sakamoto.1979 a. Hydrocellulase of *Aspergillus aculeatus*. Agric. Biol. Chem., 43 (8):1789-1790.
22- Murao,S. and R. Sakamoto.1979 b. β-glucosidase of *Aspergillus aculeatus*. Agric. Biol. Chem., 43 (8):1791-1792.
23- Okada, G. 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of Two cellulases. J. Biochem., 77:33-42.
24- Peiris, P. S. and I. Silva.1987.Hydrolysis of rice straw to fermentable sugars by Trichoderma enzymes. Mircen Journal,3:57-65.
25- Philippidis,G.P., T.K. Smith and C.E Wyman.1993.Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. Biotechnol. Bioeng., 41:846-853.
26- Sakamoto, R., M. Arai and S. Murao.1984. Enzymatic properties of xylosidase of *Termitomyces clypeatus*. Biotechnology Progress, 13 (6): 822-827.
5- Bissett, F. and D. Sternberg.1978. Immobilization of Aspergillus Beta Glucosidase on Chitosan. Applied and Environmental Microbiology, Apr., 35 (4): 750-755.
6-Busto, M.D., N. Ortega and M. Perez-Mateos.1998. Characterization of microbial endo-beta-glucanase immobilized in alginate beads. Acta Biotechnologica, 18 (3): 189-200.
7- Cai, Y.J., J.A. Buswell and S.T. Chang.1998. Beta-glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvaiella volvacea*. Enzyme of Microbial Technology, 22(2): 122-129. (Abstract).
8- Calsavara, L.P., F.F. De Moraes and G.M. Zanin.2001.Comparison of catalytic properties of free and immobilized cellobiase novozym 188. Appl. Biochem. Biotechnol., 91-93: 615-626.
9- Dubois, M., J. Hamilton and F. Smith.1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Biochem., 28: 350-356.
10- Garfin,D.E.1990.Purification Procedures: electropheretic methods. In: M.P. Deutscher (ed)., Methods in Enzymology Academic Press, New York. Vol. 182: 425-441.
11- Godfrey, T. 1983. Industrial Enzymology. Tony, Godfrey and Jon Reichelt. M., The Nature Press, UK.
12- Gouda, M.K. and M.A. Abdel-Naby.2002.Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamarii* xylanase. Microbiol. Res. 157 (4): 275-281.
13-Henriksson, G., A. Nutt, H. Henriksson, B. Pettersson, J.Stahlberg, G. Johansson and G. Pettersson.1999. Endoglucanase 28 (Cell 2A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulose. Eur. J. Biochem.,259:88-95.
14- Kim, D.W., Y.K. Jeong, Y.H. Jang and J.K. Lee.1994.Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. Fermentation and Bioengineering, 77(4): 363-369.

hydrocellulase from *Aspergillus aculeatus*. J. Ferment. Technol., 62 (6) : 561-567.

27- Segel, I.H. 1976. Biochemical Calculations. 2^{nd}. Edn. John Wiley & Sons. Inc.

28- Tavares,V.B., E. Gomes and R. Dasilva.1997. Characterization of cellulase-free xylanase producing *Bacillus sp.* for biobleaching of kraft pulp. Revista de Microbiologia, 28 (3): 179-182. (Abstract).

29- Tong,C.C.1984.Properties of cellulases produced by the isolated Aspergillus species in the biological conversion of cellulose to reducing sugars.Proceedings of the Regional Seminar-Workshop on Biotechnology in Industrial Development. Serdang, Selangor (Malaysia) p. 71-83.

30- Tsujisaka, Y., N. Hamada and R. Kobayashi.1981. Purification and some properties of an exo-β-1,3-glucanase from Basidiomycete species. Agric. Biol. Chem., 45(5):1201-1208.

31- Uchino, F. and T. Nakane.1981. A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus sp.* Agric. Biol. Chem., 45(5):1121-1127.

32- Uziie, M., M. Matsuo and T. Yasui.1985. Purification and some properties of *Chaetomium trilateale* β-xylosidase. Agric. Biol. Chem., 49(4): 1159-1166.

33- Väljamäe,P.2002.The kinetics of cellulose enzymatic hydrolysis. Implications of the synergism between enzymes. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala. Sweden.

34- Whitaker, J.R.1972.Principles of Enzymology for the Food Sciences. Dekker - New York.

35- Witkowska, D. 1990. Isolation and characteristics of cellulases from culture filtrate of *Trichoderma viride* C-1. Zeszyty-Naukowe- Akademii- Rolniczej- We-Wroclawiu . Technologia-Zywnosci (Poland). (No. 184) p. 255-266. (Abstract).

36- Wrigley,C.W.1971.Electro-Focusing. In: W.B., Jokby (ed)., Methods in Enzymology. Academic Press, New York. Vol. 22

37- Zhang, Y.P. and R. Lynd.2004. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbio., 70 (3):1563-1569.